

一条卡瓦胡椒特异 RAPD 带转化成 SCAR 标记的研究*

施 江¹, 辛 莉¹, 谭 琳², 郑学勤²

(1 河南科技大学农学院, 河南 洛阳 471003; 2 华南热带农业大学热带作物生物技术国家重点实验室, 海南 海口 571101)

摘要: 采用 27 份不同来源的胡椒属 (*Piper*) 材料和 1 份不同属的草胡椒 (*Peperomia pellucida*) 材料用引物 OPQ-03 扩增得到一条约 400 碱基对 (bp) 卡瓦胡椒特异片段。对该片段进行了克隆和序列分析, 并根据序列分析结果将上述 RAPD 分子标记转化为重复性和特异性更好的 SCAR (sequence characterized amplified regions, 序列特征化扩增区) 分子标记。本研究设计出了 1 对卡瓦胡椒特异 SCAR 引物 P7.1 (5'-GGT CAC CTC ACC GCA GCA GGA TGA ACG-3') 和 P7.2 (5'-GGT CAC CTC AAT GAC ATG GGA TGA ATC-3'), 用这对特异引物对本次试验的 28 份材料进行 PCR 扩增, 结果只有不同属的草胡椒材料无任何扩增, 其它材料均扩增出了预期大小 440 bp 的特异带。

关键词: 胡椒; 卡瓦胡椒; 胡椒属; RAPD; SCAR

中图分类号: Q 78, Q 943

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700 (2007) 04-457-04

Study on the RAPD Specific Band of Kava (*Piper*, Piperaceae)
Transferring to the SCAR Molecular Marker

SHI Jiang¹, XIN Li¹, TAN Lin², ZHENG Xue-Qin²

(1 Agriculture College, Henan University of Science & Technology, Luoyang 471003, China; 2 State Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, South China University of Tropical Agriculture, Haikou 571101, China)

Abstract: This paper studied on 28 pepper materials, including 16 cultivated papper materials, 3 wild pepper materials, 2 wild relatives of pepper materials, 6 kava (*Piper methysticum*) materials, and 1 *Peperomia pellucida* materials. According to RAPD analysis, we generate SCAR marker for identifying Kava (*Piper*, Piperaceae). A Kava-associated fragment with a length of about 400 bp was generated with OPQ-03 primer. The fragment was cloned and sequenced. PCR amplification with the specific primers P7.1 (5'-GGT CAC CTC ACC GCA GCA GGA TGA ACG-3') and P7.2 (5'-GGT CAC CTC AAT GAC ATG GGA TGA ATC-3') was performed to 28 materials, which 27 materials amplified the 440 bp specific band except for *Peperomia pellucida* Kunth.

Key words: *Piper nigrum*; *Piper methysticum*; *Piper*; Random amplified polymorphic DNA; Sequence-characterized amplified region

卡瓦胡椒 (*Piper methysticum* Font. f.), 俗称卡瓦 (Kava or kawa), 是瓦努阿图、斐济、汤加、巴布亚一新几内亚及所罗门群岛等中南太平洋诸岛野生或种植的一种多年生胡椒科胡椒属灌木类药用植物。

卡瓦胡椒具有治疗焦虑症、抑郁症、促进睡眠和提高睡眠质量的显著疗效, 对于缓解精神紧张和放松肌体都有很好的作用, 且毒副作用小。2001 年, 卡瓦胡椒种植技术被列为我国“十五”科技攻关项目。

* 基金项目: 国家十五重点攻关课题 (编号: 2001BA707B) 资助, 河南科技大学校基金资助
收稿日期: 2006-10-27, 2007-02-27 接受发表
作者简介: 施江 (1966-) 男, 博士, 河南科技大学副教授, 研究方向: 植物分子生物学与植物基因工程。
Tel: 0379-64280115; E-mail: shijiang@mail.haust.edu.cn, shijiang66@21cn.com

胡椒及其近缘种的 SCAR 分子标记研究, 目前国内外尚未见有报道。在我们进行胡椒、卡瓦胡椒与草胡椒的 RAPD 聚类分析中 (辛莉等, 2005; 施江等, 2005), 我们发现一些卡瓦胡椒的特异带。若把这些特异带转化成 SCAR 标记, 就可以提高所找到的某一 RAPD 标记在应用上的稳定性。可将该 RAPD 标记片段从凝胶上回收并进行克隆和测序, 根据其碱基序列设计一对特异引物 (18~24 个碱基左右)。以此特异引物对基因组 DNA 再进行 PCR 扩增, 便可扩增出与克隆片段同样大小的特异带。这种经过转化的特异 DNA 分子标记称为 SCAR 标记。相对于 RAPD 标记, SCAR 标记由于所用引物较长及引物序列与模板 DNA 完全互补, 因此扩增结果稳定性好、可重复性强。

1 材料方法

1.1 材料

卡瓦胡椒采自太平洋岛国, 胡椒采自兴隆热带植物

园种质资源圃, 其它胡椒属野生种采自霸王岭、儋州中国热带农业科学院、华南热带农业大学。

Taq 酶、dNTPs 购自华美生物工程公司, 克隆载体 pMD18-T 购自大连宝生生物公司, 大肠杆菌 XL-1 blue 为本室保存, SCAR 引物由上海 Sangon 公司合成, 实验材料见表 1。

1.2 植物基因组 DNA 的提取和 RAPD 扩增

参照王关林和方宏筠 (2002) 的方法, 采用 CTAB 法提取 28 份实验材料的基因组 DNA。通过对模板 DNA 用量、Mg²⁺ 浓度、退火温度、电泳上样量等几个单因子试验来建立 RAPD 稳定扩增体系和反应条件。优化的 RAPD 反应条件: 95℃, 5 min; 94℃, 1 min; 36℃, 1 min; 72℃, 2 min; 45 个循环; 72℃, 7 min。

采用 OPQ-03 随机引物对 28 份材料进行了 RAPD 扩增 (图 1)。对其中 OPQ-03-400 (前面为引物编号, 后面为片段大小) 进行回收和克隆。

1.3 从琼脂糖凝胶电泳回收卡瓦胡椒 RAPD 扩增特异带

采用 QIAGEN 公司的 QIAquickGel Extraction kit 试剂盒回收 OPQ-03-400 这条卡瓦胡椒特异带。按 TaKaRa 公司 pMD18-T vector 连接试剂盒使用说明书提供的方法, 将 PCR 回收产物分别与 pMD18-T vector 连接。16℃ 反应 2 h, 然后置于 4℃ 冰箱备用。

表 1 供试材料
Table 1 Test Materials

编号	材料名称	采集地	备注
1	山胡椒 (<i>Piper hancei</i> Maxim)	霸王岭	Piperaceae
2	草胡椒 (<i>Peperomia pellucida</i> Kunth .)	儋州两院	<i>Peperomia</i>
3	菱叶 (<i>Piper betle</i> L .)	儋州两院	原产印度尼西亚, <i>Piper</i>
4	蒟蒻 (<i>Piper sarmentosum</i> Roxb .)	两院海口校区	<i>Piper</i>
5	卡瓦胡椒 1 号 (<i>Piper methysticum</i> Forst .f ., 俗名 Kava)	南太平洋岛国斐济	<i>Piper</i> , 绿杆
6	卡瓦胡椒 2 号 (<i>Piper methysticum</i> Forst .f ., 俗名 Kava)	南太平洋岛国斐济	<i>Piper</i> , 绿杆
7	卡瓦胡椒 3 号 (<i>Piper methysticum</i> Forst .f ., 俗名 Kava)	南太平洋岛国斐济	<i>Piper</i> , 绿杆, 节部肿大
8	卡瓦胡椒 4 号 (<i>Piper methysticum</i> Forst .f ., 俗名 Kava)	南太平洋岛国斐济	<i>Piper</i> , 绿杆, 节部肿大
9	卡瓦胡椒 5 号 (<i>Piper methysticum</i> Forst .f ., 俗名 Kava)	南太平洋岛国斐济	<i>Piper</i> , 红杆
10	卡瓦胡椒 6 号 (<i>Piper methysticum</i> Forst .f ., 俗名 Kava)	南太平洋岛国斐济	<i>Piper</i> , 红杆
11	印尼大叶种 (<i>Piper nigrum</i> L .)	兴隆热带植物园	<i>Piper</i>
12	班尼约尔 1 号 (<i>Piper nigrum</i> L .)	同上	<i>Piper</i> , 原名 Panniyur-1
13	古晋 (<i>Piper nigrum</i> L .)	同上	<i>Piper</i> , 原名 Kuching
14	大山 (<i>Piper</i> sp .)	同上	<i>Piper</i>
15	山菱 (<i>Piper</i> sp .)	同上	<i>Piper</i>
16	1 号杂交种 (<i>Piper nigrum</i> L .)	同上	<i>Piper</i> , 班尼约尔 1 号 × 印尼大叶种
17	3 号杂交种 (<i>Piper nigrum</i> L .)	同上	<i>Piper</i> , 班尼约尔 1 号 × 印尼大叶种
18	5 号杂交种 (<i>Piper nigrum</i> L .)	同上	<i>Piper</i> , 班尼约尔 1 号 × 印尼大叶种
19	6 号杂交种 (<i>Piper nigrum</i> L .)	同上	<i>Piper</i> , 班尼约尔 1 号 × 印尼大叶种
20	7 号杂交种 (<i>Piper nigrum</i> L .)	同上	<i>Piper</i> , 班尼约尔 1 号 × 293 (印尼大叶种 × 班尼约尔 1 号)
21	8 号杂交种 (<i>Piper nigrum</i> L .)	同上	<i>Piper</i> , 班尼约尔 1 号 × 胜 20 (柬埔寨 × 印尼大叶种)
22	印柬 45 (<i>Piper nigrum</i> L .)	同上	<i>Piper</i> , 印尼大叶种 × 柬埔寨
23	班 293 (<i>Piper nigrum</i> L .)	同上	<i>Piper</i> , 印尼大叶种 × 班尼约尔 1 号
24	班柬印 (<i>Piper nigrum</i> L .)	同上	<i>Piper</i> , 班尼约尔 1 号 × 柬埔寨 × 印尼大叶种
25	班云大 (<i>Piper nigrum</i> L .)	同上	<i>Piper</i> , 班尼约尔 1 号 × 云选一号 × 大山
26	云选一号 (<i>Piper nigrum</i> L .)	同上	<i>Piper</i>
27	大山 × 印尼 (<i>Piper nigrum</i> L .)	同上	<i>Piper</i>
28	柬印 93 (<i>Piper nigrum</i> L .)	同上	<i>Piper</i> , 柬埔寨 × 印尼大叶种

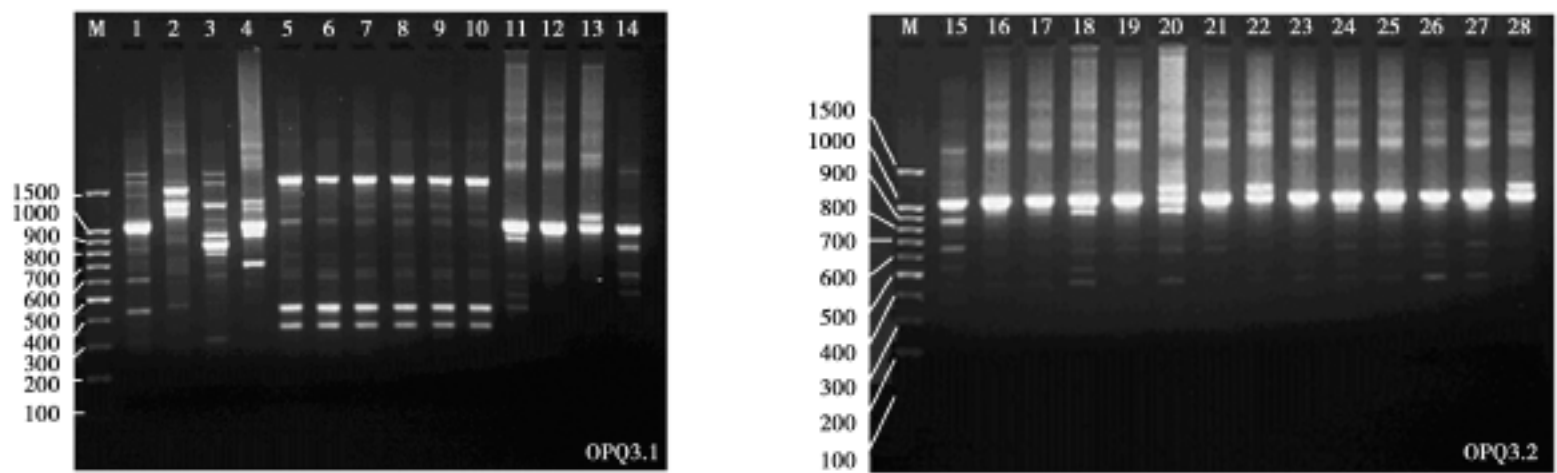


图 1 OPQ-03 在 400 bp 处卡瓦胡椒特异带
Fig .1 OPQ-03 expression in Kava with specific band at 400 bp

1.4 重组质粒的酶切鉴定 (参照黄培堂等译, 2003)

对电泳滞后的质粒进行进一步的酶切鉴定。由于 pMD18-T Vector 在外源片段插入缺口的两端近旁分别有 *Hind* 和 *Eco*RI 酶切位点, 故选用 *Hind* 和 *Eco*RI 进行双酶切以确认插入片段的大小。37 保温 3 h, 酶切反应结束后, 取反应液进行电泳检查, 用 TaKaRa 公司生产的 100 bp DNA Ladder Marker 和 MBI 公司生产的 MassRuler™ DNA Ladder 作分子量标记。

1.5 克隆产物的测序与测序结果的分析

将附加有 100 mg/L Amp 的 LB 固体培养基倒入经高压灭菌的 1.5 mL 离心管中, 待其凝固后, 挑取含有重组质粒的菌液插入培养基中, 直达管底数次, 将管盖盖紧, 封上膜, 置于 37 培养过夜。将穿刺培养物交与上海生工生物工程技术服务有限公司, 由其采用双脱氧终止法在 ABI 377 型 DNA 测序仪上进行测序。根据 OPQ-03-400 克隆片段的测序结果, 结合引物设计的一般原则, 如两条引物不能相互配对, 5 端和 3 端两条引物的 *T_m* 值相近, 两条引物的 3 端最好不能有 A, 引物长度在 20 ~ 30 碱基 (nt), 在原有随机引物的基础上, 向 3 端延伸 13 ~ 19 个 nt, 设计了 1 对 OPQ-03-400 特异 PCR 引物。

2 SACR 结果与分析

2.1 RAPD 扩增产物的回收

卡瓦胡椒特异带 OPQ-03-400 回收结果如图 2 所示 (7 号)。7 号泳道呈现出一条清晰的带, 表明此次回收是成功的, 各回收片段都比较纯, 适宜连接 T 载体。

2.2 重组质粒的酶切鉴定

少量提取重组质粒, 用 *Eco*RI 和 *Hind* 进行双酶切, 结果见图 3 (编号 7)。挑选含有目的插入片段的重组子进行穿刺培养以备测序分析。

2.3 克隆序列的测序和分析

克隆序列测序结果见图 5, 序列测定的结果较好, 两端的随机引物位点和酶切位点均正确无误。根据序列测定结果, SJ7 克隆片段的准确大小为 440 bp。

2.4 与胡椒属特异的 SCAR 标记鉴定

引物序列见表 2:

特异引物 P7.1 和 P7.2 对这 28 份材料的扩增结果显示 (图 4), 除不同属的草胡椒 (图 4 中 2 号泳道) 不出带外, 其余 27 份胡椒属材料均扩增出了预期大小 (440 bp) 的带, 说明 P7.1 和 P7.2 这对特异引物有可能是胡椒属的特异 SCAR 标记。

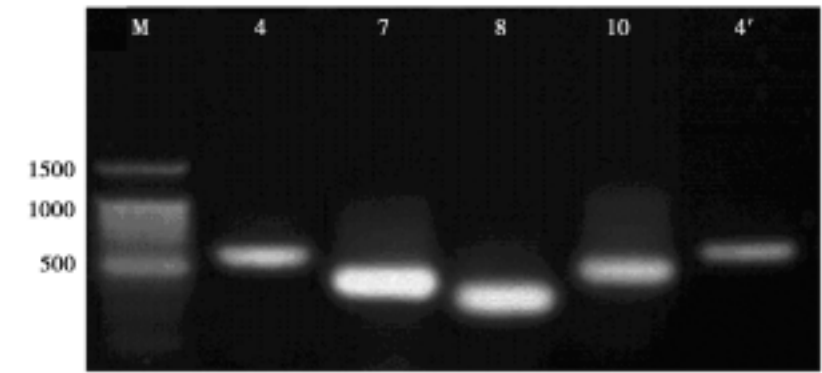


图 2 卡瓦胡椒特异带回收电泳结果 (7 号带)
Fig .2 Recovery of specific band of Kava

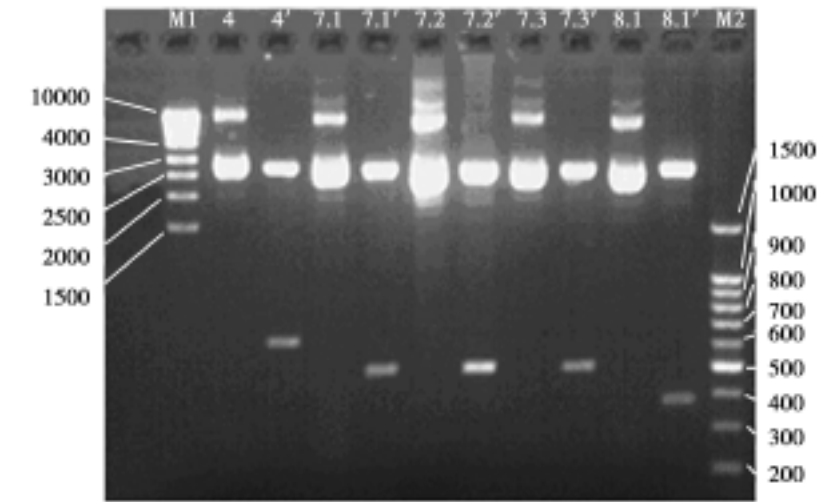


图 3 重组质粒的酶切鉴定
Fig .3 Enzymatic lysis of recombination plasmid

